

REV  
BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

PCT/DE 00/03305



REC'D 04 DEC 2000

WIPO

PCT

DE 00/3305

10/088481

10/0884L2

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung  
einer Patentanmeldung**

**PRIORITY  
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

**Aktenzeichen:**

199 45 162.1

**Anmeldetag:**

21. September 1999

**Anmelder/Inhaber:**

Professor Dr. Herbert M ä r k l, Seevetal/DE

**Bezeichnung:**

Verfahren zur Kultivierung von Zellen, Membran-  
modul, Verwendung eines Membranmoduls und  
Reaktionssystem zur Kultivierung von Zellen

**IPC:**

C 12 N 5/02

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ur-  
sprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 11. Oktober 2000  
Deutsches Patent- und Markenamt  
Der Präsident  
Im Auftrag

Faust



MM 3667

Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Kultivierung von Zellen unter Verwendung eines Reaktionssystems, wobei das Reaktionssystem einen Behälter für Dialyseflüssigkeit, einen Raum für die Kultivierung von Zellen sowie ein beide Räume miteinander verbindendes Membranmodul umfaßt, wobei das Membranmodul mindestens zwei durch eine Membran getrennte Räume aufweist, deren einer von einer Dialyseflüssigkeit und deren anderer von Zellen enthaltender Kulturflüssigkeit durchströmt wird, und ein erstes Gas in die Kulturflüssigkeit in dem Raum für die Kultivierung der Zellen und ein zweites Gas in die Kulturflüssigkeit im Membranmodul eingetragen wird.

5

**BOEHMERT & BOEHMERT**  
ANWALTSSOZIENTÄT

Boehmert & Boehmert · P.O.B. 10 71 27 · D-28071 Bremen

Deutsches Patent- und Markenamt  
Zweibrückenstr. 12

80297 München

DR.-ING. KARL BOEHMERT, PA (1899-1973)  
DIPLO.-ING. ALBERT BOEHMERT, PA (1902-1997)  
WILHELM J. H. STAHLBERG, RA, Bremen  
DR.-ING. WALTER HOORMANN, PA\*, Bremen  
DIPLO.-PHYS. DR. HEDZ GODDAR, PA\*, München  
DR.-ING. ROLAND LIESEGANG, PA\*, München  
WOLF-DIETER KUNTZE, RA, Bremen, Associate  
DIPLO.-PHYS. ROBERT MÜNZHUBER, PA (1933-1992)  
DR. LUDWIG KOUKER, RA, Bremen  
DR. (CHEM.) ANDREAS WINKLER, PA\*, Bremen  
MICHAELA HUTH-DIERIG, RA, München  
DIPLO.-PHYS. DR. MARION TÖNHARDT, PA\*, Düsseldorf  
DR. ANDREAS EBERT-WEIDENFELLER, RA, Bremen  
DIPLO.-ING. EVA LIESEGANG, PA\*, München

PROF. DR. WILHELM NORDEMANN, RA, Brandenburg  
DR. AXEL NORDEMANN, RA, Berlin  
DR. JAN BERND NORDEMANN, LL.M., RA, Berlin  
DIPLO.-PHYS. EDUARD BAUMANN, PA\*, Hohenkirchen  
DR.-ING. GERALD KLÖPSCH, PA\*, Düsseldorf  
DIPLO.-ING. HANS W. GROENING, PA\*, München  
DIPLO.-ING. SIEGFRIED SCHIRMER, PA\*, Bielefeld  
DIPLO.-ING. DR. JAN TÖNNIES, PA, RA, Kiel  
DIPLO.-PHYS. CHRISTIAN BIEHL, PA\*, Kiel  
DIPLO.-PHYS. DR. DOROTHEE WEBER-BRULS, PA\*, Frankfurt  
DR.-ING. MATTHIAS PHILIPP, PA\*, Bremen  
DIPLO.-PHYS. DR. STEFAN SCHOHE, PA\*, München  
MARTIN WIRTZ, RA, Bremen  
DR. DETMAR SCHÄFER, RA, Bremen  
DIPLO.-CHEM. DR. ROLAND WEIß, PA, Düsseldorf  
DIPLO.-PHYS. DR.-ING. UWE MANASSE, PA, Bremen  
DR. CHRISTIAN CZYCHOWSKI, RA, Berlin  
DR. CARL-RICHARD HAARMANN, RA, München  
DIPLO.-BIOL. DR. ARMIN K. BOHMANN, PA, München  
DIPLO.-PHYS. DR. THOMAS L. BITTNER, PA, Berlin  
DR. VOLKER SCHMITZ, RA, München  
DR. FRIEDRICH NICOLAUS HEISE, RA, Potsdam

PA - Patentanwalt/Patent Attorney  
RA - Rechtsanwalt/Attorney at Law  
\* - European Patent Attorney  
Alle zugelassen zur Vertretung vor dem Europäischen Markenamt, Alicante  
Professional Representatives of the Community Trademark Office, Alicante

In Zusammenarbeit mit/in cooperation with  
DIPLO.-CHEM. DR. HANS ULRICH MAY, PA\*, München

Ihr Zeichen  
Your ref.

Ihr Schreiben  
Your letter of

Unser Zeichen  
Our ref.

Bremen,

Neuanmeldung  
(Patent)

MM3667

21. September 1999

Professor Dr. Herbert Märkl, Kleckener Kirchweg 27, 21218 Sevetal

**Verfahren zur Kultivierung von Zellen, Membranmodul, Verwendung eines Membranmoduls und Reaktionssystem zur Kultivierung von Zellen**

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Kultivierung von Zellen unter Verwendung eines Reaktionssystems, wobei das Reaktionssystem einen Behälter für Dialyseflüssigkeit, einen Raum für die Kultivierung von Zellen sowie ein beide Räume miteinander verbindendes Membranmodul umfaßt, wobei das Membranmodul mindestens zwei durch eine Membran getrennte Räume aufweist, deren einer von einer Dialyseflüssigkeit und deren anderer von Zellen enthaltender Kulturflüssigkeit durchströmt wird, und ein erstes Gas in die Kulturflüssigkeit in dem Raum für die Kultivierung der Zellen eingetragen wird. Weiterhin

- 17.63 -

Hollerlallee 32 · D-28209 Bremen · P.O.B. 10 71 27 · D-28071 Bremen · Telephone +49-421-34090 · Telefax +49-421-3491768

MÜNCHEN · BREMEN · BERLIN · FRANKFURT · DÜSSELDORF · POTSDAM · BRANDENBURG · HÖHENKIRCHEN · KIEL · BIELEFELD · ALICANTE

<http://www.boehmert.de>

e-mail: [postmaster@boehmert.de](mailto:postmaster@boehmert.de)

6

betrifft die Erfindung ein Membranmodul, die Verwendung eines Membranmoduls und ein Reaktionssystem zur Kultivierung von Zellen.

Der Einsatz von Dialysemembranen im Zusammenhang mit der Kultur von Mikroorganismen bzw. von tierischen Zellen hat gewisse Vorteile in Bezug auf die erreichbaren Zelldichten bzw. der Konzentration der erhaltenen Produkte. Eine Zusammenfassung unterschiedlicher biotechnischer Produktionsverfahren, bei denen Membranen eingesetzt werden, wird von R. Pörtner und H. Märkl (Appl. Microbiol. Biotechnol. (1998) 50:403-414) gegeben. Der wesentliche Effekt der Verwendung von Dialysemembranen beruht darauf, daß wachstumshemmende Stoffwechselprodukte der eingesetzten Organismen, die während des Wachstums bzw. während der Produktion entstehen, über eine Membran abgezogen werden. Der Transport wird hierbei durch eine Konzentrationsdifferenz der genannten Stoffwechselprodukte angetrieben. In der Europäischen Patentschrift EP 0 632 827 B1 sind ein Verfahren und eine Vorrichtung beschrieben, in der die technische Nutzbarmachung des Konzepts erläutert wird. Genauer gesagt wird ein Reaktionssystem beschrieben, das aus mindestens zwei Kammern besteht, die über mindestens eine Membran miteinander gekoppelt sind und bei dem die Kultur von Mikroorganismen oder pflanzlichen oder tierischen Zellen sich in der einen Kammer befindet und die wachstumshemmenden Stoffwechselprodukte aus dieser Kammer in die Lösung der anderen Kammer gelangen.

Der dort beschriebene Einbau einer Dialysemembran direkt in den für die Kultur der Organismen vorgesehenen Raum ist im Labormaßstab (2-l-Maßstab) technisch gelöst (vergl. auch R. Pörtner und H. Märkl, aaO.). Das Scale-up dieser Technik in den Produktionsmaßstab bis zu mehreren m<sup>3</sup> beinhaltet jedoch Schwierigkeiten, die bis heute noch nicht beherrscht werden. Der Kern des Problems kann einfach erläutert werden. Es werden Membranen mit möglichst geringen Wandstärken (von wenigen µm bis zu 100 µm) angestrebt, da diese eine hohe Dialyseleistung besitzen. Diese Membranen verfügen jedoch nur über eine begrenzte mechanische Festigkeit. Die mechanische Belastung im Kulturraum ist jedoch bei schnell wachsenden aeroben Organismen sehr hoch, da es notwendig ist, große Mengen von Luft bzw. Sauerstoff für die Versorgung der Organismen einzutragen. Gleichzeitig müssen große Mengen von

Kohlendioxid abtransportiert werden. Dieses bedingt einen hohen Energieeintrag durch Rühren in der Größenordnung von  $10 \text{ kW/m}^3$ , wodurch die dünnen Membranen stark belastet werden.

In dieser Hinsicht wesentlich unproblematischer ist eine andere, ebenfalls bekannte Anordnung, wie sie in Fig. 1 dargestellt ist. Hier ist die Dialysemembran 3 in einem eigenen Membranmodul 8 außerhalb des Kultorraumes 2 untergebracht. Die Kulturflüssigkeit wird mit Hilfe einer Pumpe 10 durch das Membranmodul 8 gepumpt. Entsprechend wird das Membranmodul 8 über eine zweite Pumpe 9 mit Dialyseflüssigkeit aus dem Behälter 1 versorgt. Das Scale-up dieser Anordnung in den großen Produktionsmaßstab ist unproblematisch, da die Anordnung im wesentlichen aus drei voneinander unabhängigen Einheiten, zwei Behälter und einem Membranmodul, besteht, die unabhängig von einander dimensioniert werden können. Diese Anordnung hat jedoch, wie von Ogbonna, J. Ch. und Märkl, H.. (Biotechnology and Bioengineering, Vol. 41, S. 1092-1100 (1993)), am Beispiel dichter E.coli-Kulturen gezeigt wurde, den erheblichen Nachteil, daß ein Teil der Mikroorganismen für eine gewisse Zeit den Kultorraum 2 verläßt und während der Dialyse im Membranmodul 8 nicht mit Sauerstoff versorgt wird. Im zitierten Beispiel wird die Zeit, die ein bestimmter Organismus auf seinem Weg durch das Dialysemodul außerhalb des begasteten Kultorraumes verbringt, mit 11 Sekunden angegeben. Als Folge dieser sich wiederholenden zeitlich begrenzten Unterversorgung verringert sich die erreichbare Zelldichte auf einen Wert von  $110 \text{ g Trockengewicht/Liter}$ . In einer allerdings nicht Scale-up-fähigen Anordnung mit in den Kultorraum integrierter Membran, also bei zeitlich ununterbrochener Sauerstoffversorgung, wird unter sonst gleichen Bedingungen eine Organismendichte von  $160 \text{ g Trockengewicht/Liter}$  erreicht.

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, das im Stand der Technik bekannte Reaktionssystem für die Kultivierung von Zellen nach Fig. 1, das mindestens einen Raum für die Kultivierung von Zellen (2), einen Behälter für Dialyseflüssigkeit (1) und ein dazwischengeschaltetes Membranmodul (8), durch das wachstumshemmende Stoffe aus der Kulturflüssigkeit in die Dialyseflüssigkeit gelangen, umfaßt, so weiter zu entwickeln, daß höhere Zelldichten erreicht werden.

Eine weitere Aufgabe bestand in der Bereitstellung eines zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens geeigneten Reaktionssystems.

Erfindungsgemäß wird die Aufgabe gelöst durch ein Verfahren zur Kultivierung von Zellen unter Verwendung eines Reaktionssystems, wobei das Reaktionssystem einen Behälter für Dialyseflüssigkeit, einen Raum für die Kultivierung von Zellen sowie ein beide Räume miteinander verbindendes Membranmodul umfaßt, wobei das Membranmodul mindestens zwei durch eine Membran getrennte Räume aufweist, deren einer von einer Dialyseflüssigkeit und deren anderer von Zellen enthaltender Kulturflüssigkeit durchströmt wird, und ein erstes Gas in die Kulturflüssigkeit in dem Raum für die Kultivierung der Zellen eingetragen wird und ein zweites Gas in die Kulturflüssigkeit im Membranmodul eingetragen wird.

In einer Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens ist vorgesehen, daß eine direkte Begasung der im Membranmodul befindlichen Kulturflüssigkeit erfolgt, indem das zweite Gas direkt in die Kulturflüssigkeit im Membranmodul eingetragen wird.

In einer alternativen Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens ist vorgesehen, daß eine indirekte Begasung der im Membranmodul befindlichen Kulturflüssigkeit erfolgt, indem das zweite Gas in die Dialyseflüssigkeit in dem Behälter für die Dialyseflüssigkeit eingetragen wird und von dort über die Membran des Membranmoduls in die im Membranmodul befindliche Kulturflüssigkeit gelangt.

In einer bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Verfahren erfolgt neben der direkten Begasung gleichzeitig die indirekte Begasung.

In einer Ausführungsform umfaßt das Membranmodul mindestens ein Gaszufuhrmittel und führt das Gaszufuhrmittel das zweite Gas zu mindestens einem der durch die Membran getrennten, eine Flüssigkeit führenden Räume zu.

Dabei ist bevorzugt, daß das Gaszufuhrmittel eine Austrittsöffnung aufweist, die sich insbesondere in dem die Kulturflüssigkeit führenden Raum des Membranmoduls befindet.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform ist das Gaszufuhrmittel ein Röhrchen.

In einer ganz besonders bevorzugten Ausführungsform ist das Gaszufuhrmittel als Düse ausgebildet.

In einer Ausführungsform ist vorgesehen, daß die Membran des Membranmoduls aus einem Material besteht, das ausgewählt ist aus der Gruppe, die regenerierte Cellulose, Polyamid, Polypropylen und Polysulfon umfaßt.

In einer weiteren Ausführungsform ist vorgesehen, daß das Membranmodul ein Plattenmodul ist.

In einer Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens wie auch des erfindungsgemäßen Membranmoduls ist vorgesehen, daß die Membran des Membranmoduls eine Dialysemembran ist.

Dabei ist besonders bevorzugt, daß das Material der Dialysemembran Cuprophan ist.

In einer bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Verfahren sieht das Membranmodul bedingt durch sein Flächen-Volumen-Verhältnis und/oder seinen Permeabilitätskoeffizienten für das Gas einen für die Zellen ausreichenden Gasaustausch vor.

In einer Ausführungsform ist dabei vorgesehen, daß das Flächen-Volumen-Verhältnis mindestens etwa  $5 \text{ m}^2$  pro Liter, insbesondere mindestens  $10 \text{ m}^2$  pro Liter beträgt.

In einer bevorzugten Ausführungsform beträgt das Flächen-Volumen-Verhältnis etwa  $13 \text{ m}^2$  pro Liter beträgt.

In einer weiteren Ausführungsform beträgt der Sauerstoff-Permeabilitätskoeffizient etwa 0,066 cm pro Minute oder mehr.

In eine Ausführungsform kann vorgesehen sein, daß der Behälter für Dialyseflüssigkeit ein Mittel zum Zuführen von Gas und/oder zum Abführen von Gas aufweist.

Weiterhin kann bei den erfindungsgemäßen Verfahren vorgesehen sein, daß das Membranmodul, der Raum für die Kultivierung der Zellen und/oder der Behälter für Dialyseflüssigkeit einen erhöhten Druck aufweist.

Bei den erfindungsgemäßen Verfahren kann vorgesehen sein, daß das erste und zweite Gas einzeln und unabhängig voneinander ausgewählt ist aus der Gruppe, die Luft, Sauerstoff, Stickstoff, Kohlendioxid und Mischungen davon umfaßt.

In einer bevorzugten Ausführungsform ist das zweite Gas Sauerstoff.

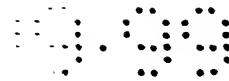
In einer alternativen Ausführungsform ist das zweite Gas Kohlendioxid.

Bei den erfindungsgemäßen Verfahren kann vorgesehen sein, daß die Zellen ausgewählt sind aus der Gruppe, die mikrobielle Zellen, Pilzzellen, tierische Zellen und pflanzliche Zellen umfaßt.

Ganz besonders bevorzugt ist, wenn die Zellen Zellen von *Escherichia coli* sind.

Weiterhin wird die Aufgabe gelöst durch ein Membranmodul welches mindestens zwei durch eine Membran getrennte Räume umfaßt und jeder Raum mit einer Flüssigkeit durchströmt wird, die Flüssigkeit in einem Raum Dialyseflüssigkeit und in dem anderen Raum Kulturflüssigkeit ist, und wobei das Membranmodul mindestens ein Gaszufuhrmittel umfaßt und das





Gaszufuhrmittel in mindestens einem der durch die Membran getrennten Räume eine Austrittsöffnung aufweist.

In einer Ausführungsform ist vorgesehen, daß die Membran röhrenförmig ausgebildet ist und durch ihr Volumen einen der beiden Räume ausbildet.

Dabei kann weiterhin vorgesehen sein, daß der Durchmesser des durch die röhrenförmige Membran ausgebildeten Raumes etwa 3 - 10 mm, bevorzugt 6 - 8 mm, beträgt.

In einer Ausführungsform umfaßt das erfindungsgemäße Membranmodul mehrere durch eine röhrenförmige Membran ausgebildete Räume.

In einer weiteren Ausführungsform befindet sich in mindestens einem der durch die röhrenförmige Membran ausgebildeten Räume eine Austrittsöffnung des Gaszufuhrmittels.

Dabei kann vorgesehen sein, daß sich die Austrittsöffnung des Gaszufuhrmittels in einem Raum außerhalb des/der durch die röhrenförmige Membran ausgebildeten Raumes/Räume befindet.

In einer bevorzugten Ausführungsform ist das Gaszufuhrmittel ein Röhrchen.

In einer ganz besonders bevorzugten Ausführungsform ist das Röhrchen konzentrisch in dem Raum angeordnet.

Bei dem erfindungsgemäßen Membranmodul kann vorgesehen sein, daß das Röhrchen einen Innendurchmesser von 0,2 mm bis 3 mm aufweist.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform ist die Austrittsöffnung des Gaszufuhrmittels als Düse ausgebildet.

Die Aufgabe wird erfindungsgemäß auch durch die Verwendung des erfindungsgemäßen Membranmoduls einem Verfahren nach der Erfindung gelöst.

Desweiteren wird die Aufgabe gelöst durch die Verwendung eines Membranmoduls, welches einen Gaspermeabilitätskoeffizienten, der hoch genug ist, um eine ausreichende Gasversorgung während der Passage der Kulturflüssigkeit durch das Membranmodul oder einen ausreichenden Gasaustausch in der im Membranmodul befindlichen Kulturflüssigkeit zu gewährleisten, und/oder ein geeignet hohes Flächen-Volumen-Verhältnis aufweist, um eine ausreichende Gasversorgung während der Passage der Kulturflüssigkeit durch das Membranmodul oder einen ausreichenden Gasaustausch in der im Membranmodul befindlichen Kulturflüssigkeit zu gewährleisten.

Genauere Angaben zu den beiden genannten Faktoren und wie diese zu bestimmen sind, ergibt sich aus der Beschreibung der Figuren und auch aus der Beschreibung der hierin offenbarten Verfahren.

Desweiteren wird die Aufgabe erfindungsgemäß gelöst durch ein Reaktionssystem zur Kultivierung von Zellen umfassend einen Behälter für Dialyseflüssigkeit, einen Raum für die Kultivierung von Zellen und mindestens ein dazwischen geschaltetes Membranmodul, wobei das Membranmodul eine ausreichende Gasversorgung während der Passage der Kulturflüssigkeit durch das Membranmodul oder einen ausreichenden Gasaustausch in der im Membranmodul befindlichen Kulturflüssigkeit gewährleistet.

In einer bevorzugten Ausführungsform ist das Membranmodul ein erfindungsgemäßes Membranmodul.

In einer weiteren Ausführungsform enthält der Behälter für Dialyseflüssigkeit mindestens eine Begasungseinrichtung.

13

In einer noch weiteren Ausführungsform weist die Membran des Membranmoduls einen Gas-permeabilitätskoeffizienten, der hoch genug ist, um eine ausreichende Gasversorgung während der Passage der Kulturflüssigkeit durch das Membranmodul oder einen ausreichenden Gasaustausch in der im Membranmodul befindlichen Kulturflüssigkeit zu gewährleisten und/oder ein geeignet hohes Flächen-Volumen-Verhältnis auf, um eine ausreichende Gasversorgung während der Passage der Kulturflüssigkeit durch das Membranmodul oder einen ausreichenden Gasaustausch in der im Membranmodul befindlichen Kulturflüssigkeit zu gewährleisten.

Der Erfindung liegt die überraschende Kenntnis zugrunde, daß durch Begasung der zu kultivierenden Zellen während der Passage durch das Membranmodul die zeitlich begrenzte Unterversorgung der Zellen mit Gas, insbesondere mit Sauerstoff im Falle von aeroben oder fakultativ aeroben Zellen, vermieden wird und somit höhere Zelldichten erreicht werden.

Der prinzipielle Aufbau des im Rahmen des erfindungsgemäßen Verfahrens verwendeten Reaktionssystems ist in Fig. 2 dargestellt. Obwohl in Fig. 2 nur ein Membranmodul dargestellt ist, kann das Reaktionssystem selbstverständlich mehrere parallel geschaltete Membranmoduleinheiten umfassen.

Im Rahmen des erfindungsgemäßen Verfahrens kann dabei vorgesehen sein, daß der erforderliche Gasaustausch oder die erforderliche Gaszufuhr, bspw. in Form der Zufuhr von Sauerstoff im Falle von aeroben oder fakultativ aeroben Organismen, direkt zu der im Membranmodul enthaltenen Kulturflüssigkeit erfolgt. Dies wird hierin als direkte Begasung bezeichnet. Die direkte Begasung kann dabei so erfolgen, daß Gas direkt über ein in das Membranmodul integriertes Gaszufuhrmittel (15,16) der – in der Regel Zellen enthaltenden – Kulturflüssigkeit zugeführt wird. Zu diesem Zweck kann im Rahmen der Erfindung das erfindungsgemäße Membranmodul verwendet werden bzw. dieses in dem Reaktionssystem, wie es im Rahmen des erfindungsgemäßen Verfahrens verwendet wird, umfaßt sein.

Alternativ kann bei dem erfindungsgemäßen Verfahren der erforderliche Gasaustausch in der im Membranmodul enthaltenen Kulturflüssigkeit oder die dorthin erforderliche Gaszufuhr, wie sie hierin beschrieben ist, durch eine indirekte Begasung erfolgen. Die indirekte Begasung oder Gasversorgung erfolgt durch eine Begasung der Dialyseflüssigkeit 18 im Behälter für Dialyseflüssigkeit 1. Hierbei wird eine Gaszu- 21 und Gasabfuhrleitung 22 sowie in der Regel ein Rührwerk 23 eingesetzt. Die mit Gas angereicherte Dialyseflüssigkeit wird über eine Pumpe 9 durch das Membranmodul 8 gepumpt und kann über die Membran 3 das Gas an die Kulturflüssigkeit abgeben. Wichtige Parameter für die indirekte Begasung sind neben der Gaseintragsleistung in den Behälter mit Dialyseflüssigkeit der Permeabilitätskoeffizient der Membran des Membranmoduls für das jeweils betrachtete, d.h. eingetragene Gas und das Flächen-Volumen-Verhältnis des Membranmoduls.

Dabei ist es im Rahmen der Erfindung, daß bei dem erfindungsgemäßen Verfahren beide Formen der Begasung gleichzeitig angewandt werden, wobei es jedoch durchaus Phasen bei der Kultivierung der Zellen geben kann, wo auch nur eine der beiden Begasungsformen angewandt wird.

Die ausschließlich direkte Begasung wie auch die ausschließliche indirekte Begasung stellen somit Extremfälle dar.

Je nach dem Verhältnis der für die Begasung zur Verfügung stehenden Membranfläche sowie deren Durchlässigkeit für das zu transportierende Gas und dem zu begasenden im Membranmodul 8 befindlichen Kulturvolumen, wird der Anteil der direkten (über die Gaszufuhrmittel 15,16) und der indirekten (über die Membran 3) Begasung unterschiedlich sein. Dabei ist grundsätzlich auch die in den Behälter mit Dialyseflüssigkeit, genauer die darin enthaltene Dialyseflüssigkeit, eintragbare Menge des betrachteten Gases zu berücksichtigen.

Ist beispielsweise durch die indirekte Begasung durch das Membranmodul 8 bedingt durch sein hohes Flächen-Volumen-Verhältnis und/oder den hohen Permeabilitätskoeffizienten der eingesetzten Membran für das in Frage stehende Gas, insbesondere Sauerstoff im Falle von

aeroben und fakultativ aeroben Zellen, eine ausreichende Gasversorgung über die Membran möglich, kann die direkte Begasung über ein gesondertes Gaszufuhrmittel bzw. unter Verwendung des hierin offenbarten Membranmoduls entfallen.

Im allgemeinen kann die in den beschriebenen Membranmodulen eingesetzte Membran unabhängig vom Begasungstyp aus Cuprophane (regenerierte Zellulose), Polyamid, Polypropylen, Polysulfon oder anderen natürlichen oder synthetischen Stoffen bestehen. Es kann sich dabei um eine Dialysemembran (Ausschlußgröße („cut off“): 10.000 Dalton), um eine mikroporöse Membran (Ausschlußgröße : 0,2  $\mu\text{m}$ ) oder um Membranen handeln, deren Durchlässigkeit (cut off) dazwischen liegt.

Die vom Fachmann in diesem Zusammenhang anzustellenden Überlegungen werden in den Beispielen veranschaulicht.

Die Erfindung wird nun im folgenden anhand der beigegeführten Zeichnungen weiter erläutert, wobei sich daraus weitere Vorteile und Ausführungsformen der Erfindung ergeben. Es zeigt

Fig. 1 ein Reaktionssystem nach dem Stand der Technik zur Kultivierung von Zellen umfassend einen Kulturraum 2, einen Behälter für Dialyseflüssigkeit 1 und eine Dialysemembran 3 enthaltendes separates Membranmodul 8;

Fig. 2 das erfindungsgemäße Reaktionssystem, das im Rahmen des erfindungsgemäßen Verfahrens verwendet wird,

Fig. 3 das erfindungsgemäße Membranmodul; und

Fig. 4 ein Plattenmodul der Firma Gambro Medizintechnik GmbH.

Fig. 1, die den grundlegenden Aufbau des gattungsgemäßen Reaktionssystems darstellt, wobei jene Version aufgezeigt wird, bei der das eine Dialysemembran 3 enthaltende Membranmodul 8 außerhalb des Kulturraumes 2 untergebracht ist, wurde bereits in der Einleitung der Beschreibung kurz diskutiert.

Kulturraum 2 enthält Kulturflüssigkeit 17, und im angeimpften Zustand die zu kultivierenden Zellen, die über Zuleitung 5 mit Sauerstoff versorgt werden. Die Sauerstoffversorgung kann dabei so erfolgen, daß Luft, Luft-Sauerstoff-Gemische oder reiner Sauerstoff zugeführt wird. Die an der Austrittsstelle der Zuleitung 5 gebildeten Gasbläschen 7 steigen in der Kulturflüssigkeit nach oben, wobei sie durch das Rührwerk 4 im Kulturraum 2 weiter dispergiert werden. Die verbleibenden Gase, ggf. gemeinsam mit den gasförmigen Reaktionsprodukten werden sodann über Ableitung 6 aus dem Kulturraum abgeleitet. Kulturraum 2 ist über Leitung 13 und 14 mit dem die Dialysemembran 3 enthaltenden Membranmodul 8 verbunden. Mittels Pumpe 10 wird Kulturflüssigkeit aus Kulturraum 2 in das Membranmodul gefördert und von dort über Leitung 14 wieder Kulturraum 2 zugeführt. Der Behälter für Dialyseflüssigkeit 1 ist mit Dialyseflüssigkeit gefüllt und über Leitung 11 und 12 mit dem Dialysemembran 3 enthaltenden Membranmodul 8 verbunden. Vermittels Pumpe 9 wird Dialyseflüssigkeit aus dem Behälter für Dialyseflüssigkeit 1 durch das Membranmodul 8 gefördert und über Leitung 12 dem Behälter für Dialyseflüssigkeit 1 wieder zugeführt.

Bei dieser schematischen Darstellung sind weitere Einrichtungen für das Reaktionssystem, wie sie den Fachleuten geläufig sind, nicht dargestellt, wie z. B. Meßeinrichtungen, Probeneinrichtungen, Einrichtungen zur Medienzu- und -abfuhr sowie zur Substratzufuhr und -abfuhr, Einrichtungen zum Austausch der Dialyseflüssigkeit und dergleichen.

Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren kann dabei das in Fig. 2 dargestellte erfindungsgemäße Reaktionssystem verwendet werden, welches eine Weiterentwicklung des in Fig. 1 gezeigten Reaktionssystems darstellt. Es umfaßt einen Behälter für Dialyseflüssigkeit, einen Raum für die Kultivierung der Zellen und ein dazwischengeschaltetes Membranmodul, welches als Dialysemodul fungiert. Das Membranmodul kann entweder das erfindungsgemäße

Membranmodul, wie in einer Ausführungsform in Fig. 3 dargestellt, sein oder ein Membranmodul mit einem Gaspermeabilitätskoeffizienten, der hoch genug ist, um eine ausreichende indirekte Gasversorgung während der Passage der Kulturflüssigkeit durch das Membranmodul zu gewährleisten und/oder ein geeignet hohes Flächen-Volumen-Verhältnis aufweist, um eine ausreichende Gasversorgung während der Passage der Kulturflüssigkeit durch das Membranmodul zu gewährleisten, das erfindungsgemäß in dem erfindungsgemäßen Reaktionssystem verwendet wird. Es ist jedoch auch möglich, daß beide Begasungsarten gleichzeitig verwendet werden und sodann das Reaktionssystem wie in Fig. 2 dargestellt ausgestaltet ist.

Im folgenden werden die verschiedenen realisierbaren Begasungsarten diskutiert. Sofern dabei Luft oder Sauerstoff als Gas angegeben wird, ist der jeweils angesprochene Aspekt nicht auf dieses spezielle Gas beschränkt, sondern dient lediglich der beispielhaften Veranschaulichung. Im Rahmen der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung prinzipiell eines jeden Gases möglich.

Die direkte Begasung wird dabei so realisiert, daß im Membranmodul im unteren Bereich der röhrenförmigen Membranen Röhrchen 16 als Gaszufuhrmittel konzentrisch angeordnet werden, die in diesem Fall die Gaszufuhrmittel darstellen. Durch diese Röhrchen wird in der vorliegenden Ausführungsform unter erhöhtem Druck sauerstoffhaltiges Gas in den Membraninnenraum, d. h. den durch die röhrenförmige Membran ausgebildeten Raum, eingebracht, der Kulturflüssigkeit zusammen mit den zu kultivierenden Zellen enthält. Die Röhrchen sind im vorliegenden Fall untereinander durch eine Zuführleitung 15 verbunden. Die Röhrchen, deren Innendurchmesser 0,2 - 3 mm beträgt, können im Gasauslaßbereich eine Verengung enthalten, die als Düse ausgebildet sein kann, um die Menge des ausströmenden Gases zu begrenzen. Durch die Zuführleitung 15 wird der Organismenkultur Luft zugeführt, der auch Sauerstoff zugemischt werden kann. Es ist auch möglich, für die Begasung reinen Sauerstoff einzusetzen. Weiterhin ist es möglich, das Membranmodul insgesamt unter einen erhöhten Druck zu setzen, um den Partialdruck des Sauerstoffs im beschriebenen Gasgemisch zu erhöhen und damit die Sauerstoffzufuhr in die die Organismen enthaltende Suspension ebenfalls zu erhöhen.

Die indirekte Begasung erfolgt dabei in dem erfindungsgemäßen Verfahren dadurch, daß das Dialysegefäß 1 über eine Gaszufuhr 21 begast und damit die Dialyseflüssigkeit mit Sauerstoff angereichert wird. Das bezüglich Sauerstoff abgereicherte Gas verläßt den Dialysebehälter über die Leitung 22. Die sauerstoffhaltige Dialyseflüssigkeit wird über die Pumpe 9 in das Membranmodul 8 transportiert, wo der Sauerstoff über die Dialysemembran an die zu kultivierenden Zellen, bspw. Mikroorganismen, enthaltende Suspension abgegeben wird. Die indirekte Gasversorgung, d.h. Sauerstoffversorgung hängt wesentlich vom Transportvermögen der Membran im vorliegenden Fall für Sauerstoff und/oder der verfügbare Membranfläche im Verhältnis zu dem zu versorgenden Volumen.

Diese Eigenschaften besitzt das Membranmodul der Firma Gambro, wie es in Fig. 4 schematisch dargestellt ist. Hierbei werden flache Membranen 3 in einem gewissen Abstand angeordnet, wobei jeweils zwei Membranen einen Raum ausbilden, der von der Kulturflüssigkeit 17 durchströmt wird. Der Außenbereich wird vom Dialysat 18 durchströmt. Die Membranen werden durch eine Stützstruktur 19 gehalten.

Eine detaillierte Beschreibung des Membranmoduls wird im Zusammenhang mit Fig. 4 gegeben.

Wie bereits ausgeführt kann im Rahmen des erfindungsgemäßen Verfahrens neben der direkten Begasung auch eine indirekte Begasung unter Verwendung eines wie in Fig. 4 gezeigten Membranmoduls erfolgen. Dabei kann auch vorgesehen sein, daß die indirekte Begasung über die Dialyseflüssigkeit entfallen kann, wenn die direkte Begasung ausreicht. Umgekehrt kann auch die direkte Begasung über das mit Gaszufuhrmitteln versehene Membranmodul, wie es in Fig. 3 beschrieben ist, entfallen, wenn das Membranmodul infolge seines hohen Flächen-Volumen-Verhältnisses und günstigen Transportverhaltens eine ausreichende Versorgung mit Gas gewährleistet.



Die Betriebsweise des aufgezeigten Reaktionssystems, seine apparatetechnische Ausstattung und das unter seiner Verwendung realisierbare Verfahren zur Kultivierung von Zellen entspricht ansonsten sinngemäß jener bzw. jenem, wie im Zusammenhang mit der erfindungsgemäßen Vorrichtung in Fig. 1 dargestellt.

Tatsächlich haben Experimente mit der Kultur von *E.coli* und der in Fig. 2 angegebenen Anordnung unter Verwendung des in Fig. 4 dargestellten Membranmoduls und der dort diskutierten Sauerstoffversorgung in eigenen Experimenten hervorragende Ergebnisse erbracht. Die erreichten Zelldichten von 160 g Trockengewicht/Liter entsprechen jenen, die mit einem Reaktionssystem erreicht werden, bei dem die Membran direkt in den Reaktionsraum integriert war. Die Experimente zeigen, daß eine Beeinträchtigung des Wachstums durch zeitlich befristeten Sauerstoffmangel nicht auftritt.

Sollte in einem Fall eine weitere Erhöhung der Sauerstoffversorgung über die Membran gewünscht sein, so stehen hierfür weitere Maßnahmen zur Verfügung. Es ist beispielsweise möglich, durch eine Leitung 20 (Fig. 2) zusätzlich gasförmigen Sauerstoff in das Membranmodul auf Seiten der Dialyseflüssigkeit einzutragen. Dieser löst sich im Verlauf der Membranpassage in der Dialyseflüssigkeit. Somit erhöht sich das für die Sauerstoffversorgung maßgebliche Konzentrationsgefälle  $(c_1 - c_2)_{\text{Mittel}}$ .

Eine Erhöhung der Sauerstoffkonzentration im Dialysat ist auch möglich, in dem das gesamte Druckniveau der Anordnung nach Fig. 2 angehoben wird. Bei einer Verdoppelung des Drucks vom Druckniveau der Umgebung von  $10^5$  Pa auf  $2 \cdot 10^5$  Pa, um ein Beispiel zu nennen, lassen sich auch die entsprechenden Sauerstoffgehalte im Dialysat verdoppeln. Damit erhöht sich entsprechend die Sauerstoffversorgung des Kulturmediums im Membran- bzw. Dialysemodul (Die Begriffe Membranmodul und Dialysemodul können hierin synonym verwendet werden.)

Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren zum Kultivieren von Zellen sind ein oder mehrere der folgenden Schritte umfaßt, wobei die Kultivierung in einem derartigen gattungsgemäßen Reaktionssystem den Fachleuten auf dem Gebiet prinzipiell bekannt ist: a) Bereitstellen eines

20

Reaktionssystems umfassend ein Kulturgefäß (Kulturraum), ein externes Membranmodul, welches die erfindungsgemäße Vorrichtung, d.h. das erfindungsgemäße Membranmodul oder ein kommerziell erhältliches Membranmodul mit den erforderlichen Eigenschaften (Flächen-Volumen-Verhältnis, Sauerstoffpermeabilitätskoeffizient) und einen Behälter für Dialyseflüssigkeit umfaßt, wobei das Reaktionssystem, wie auch die darin enthaltenen Flüssigkeiten, bevorzugt sterilisiert wurde, b) Inokulieren des Kulturgefäßes mit den zu kultivierenden Zellen, c) Bereitstellen einer geeigneten Temperatur, Substrat- und Sauerstoffversorgung, d) Führen der Kulturflüssigkeit, die die zu kultivierende Zellsuspension enthält, aus dem Kulturgefäß durch die Dialysevorrichtung und Rückführen der Kulturflüssigkeit zum Kulturgefäß unter gleichzeitigem Kreisführen der Dialyseflüssigkeit aus dem Behälter für Dialyseflüssigkeit durch die Dialysevorrichtung zurück in den Behälter für Dialyseflüssigkeit, wobei die beiden Flüssigkeitsströme bevorzugt im Gegenstrom geführt werden, und e) Ernten der kultivierten Zellen.

Obwohl die vorstehenden Ausführungen weitestgehend im Zusammenhang mit der Kultivierung von Mikroorganismen, insbesondere E.coli, erfolgt sind, ist die Verwendung der erfindungsgemäßen Vorrichtung, der Reaktionssysteme oder des Verfahrens in keinsten Weise darauf beschränkt.

Bei den im Zusammenhang mit der Vorrichtung, der Verwendung, den Reaktionssystemen und den Verfahren der vorliegenden Erfindung verwendeten Zellen können auch photosynthetische Zellen verwendet werden, unabhängig davon, ob es sich dabei um prokaryontische oder eukaryontische Zellen, mithin um photosynthetisch aktive mikrobielle oder pflanzliche Zellen handelt.

Ein Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft somit die Versorgung von Zellen mit Sauerstoff.

Ein anderer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft die Beseitigung von Gasen bzw. gasförmigen Stoffwechselprodukten, wie sie in Kulturen von Zellen auftreten. Dabei spielt die

Überlegung eine Rolle, daß der Vorgang des Eintragens von Gasen im Prinzip, zumindest was die physiko-chemischen Vorgänge dabei anbelangt, ähnlich dem des Austragens von Gasen ist. Dabei kann unter dem Einfluß des Einführens, insbesondere Einblasen, eines Gases, ein anderes oder gleiches Gas aus der Flüssigkeit entfernt werden. Im vorliegenden Fall kann dieses Flüssigkeit die Kulturraumflüssigkeit (Medium) und/oder die Dialyseflüssigkeit sein. Insoweit kann die erfindungsgemäße Vorrichtung dazu verwendet werden, Gase aus der Flüssigkeit in dem/den Reaktionssystem(en) oder einem Teil davon zu entfernen. Dies gilt auch für den Fall der erfindungsgemäßen der Verwendung eines Membranmoduls.

Beispielhaft seien einige derartige Kultivierungssysteme angeführt, bei denen sich das Strippen gasförmiger Stoffwechselprodukte als vorteilhaft erwiesen hat.

Bei photosynthetisch aktiven Zellen, beispielsweise pflanzlichen Zellen oder Algen, wird typischerweise Kohlendioxid dem Kulturmedium zugesetzt. Dies kann unter Verwendung eines entsprechend ausgelegten Membranmoduls oder der erfindungsgemäßen Vorrichtung erfolgen, wobei für die Auslegung der Begasungsvorrichtung bzw. des verwendeten membranmoduls Berechnungen anzustellen sind, die ähnlich den obigen zur Sauerstoffversorgung von Escherichia coli-Kulturen sind, und den Fachmann in die Lage versetzen, die erforderliche Menge an Kohlendioxid der Kultur zuzuführen. Gleichzeitig ist es bei hochdichten Kulturen derartiger Zellen erforderlich, den infolge der photosynthetischen Aktivität der Zellen entstandenen Sauerstoff aus dem Medium zu entfernen. Auch dies kann durch die erfindungsgemäße Vorrichtung bzw. Verwendung eines Membranmoduls bewerkstelligt werden. Die Begasung wird, unter Einstellung geeigneter Partialdrücke, typischerweise unter Verwendung eines Gemisches aus Luft und Kohlendioxid erfolgen.

Ein weiteres Beispiel für den Aspekt der Erfindung betreffend das Entfernen von Gasen aus Flüssigkeiten gemäß der vorliegenden Erfindung stellt die Kultivierung von Pyrococcus dar. Hier ist die Begasung mit Stickstoff, oder einem Gemisch aus Stickstoff und Kohlendioxid für das Erreichen hoher Zelldichten erfolgreich. Die entsprechende Offenbarung hierzu von Kra-

he, M. FEMS Microbiology reviews 18 (1995) 271 – 285 wird hierin durch Bezugnahme aufgenommen.

Der Fachmann wird somit, wann immer die Gaszufuhr bzw. –abfuhr für die Kultivierung von Zellen hilfreich oder erforderlich scheint, oder mit anderen Worten, der Gasstoffwechsel einer Kultur von Bedeutung für die Kultivierung der Zellen ist, auf die Vorrichtung, Verwendung, Reaktionssysteme und Verfahren nach der vorliegenden Erfindung zurückgreifen (können).

Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren kann das vorbeschriebene Reaktionssystem verwendet werden. Dabei kann vorgesehen sein, daß entweder das Behältnis 1 mit der Dialyseflüssigkeit oder das eigentliche Kulturgefäß, d. h. der Kulturraum, oder beide, batchweise, semi-kontinuierlich, oder kontinuierlich betrieben werden. Neben der Begasung in der erfindungsgemäßen Vorrichtung kann die Begasung im Kulturraum und/oder im Behälter für Dialyseflüssigkeit, genauer in der Dialyseflüssigkeit (oder Dialysat 18) erfolgen. Im Kulturgefäß können prinzipiell jegliche Formen von Zellen kultiviert werden, d. h. prokaryontische und eukaryontische Zellen, insbesondere Mikroorganismen, Pilzzellen, tierische Zellen und Pflanzenzellen. Im Kulturgefäß liegen die Zellen typischerweise in Suspension vor. Hinsichtlich der Betriebsweise, insbesondere des Kulturgefäßes, ist jede denkbare Fütterungsstrategie möglich, so beispielsweise und insbesondere auch fedbatch oder split feed strategy, die beispielsweise beschrieben ist Ogbonna, J. Ch. und Märkl, H.; Biotechnology and Bioengineering Vol. 41, S. 1092 - 1100 (1993), deren Offenbarungsgehalt hierin vollumfänglich aufgenommen wird. Dabei wird entsprechend den Nährstoffbedingungen der Kultur selektiv die ansonsten limitierenden Substrate, wie beispielsweise eine Kohlenstoffquelle, eine Stickstoffquelle und/oder bestimmte Salze hinzugefügt.

Fig. 3 zeigt das erfindungsgemäße Membranmodul, das als Membranmodul 8 beispielsweise in das in Fig. 1 oder Fig. 2 gezeigte Reaktionssystem eingebaut werden kann, d. h. als separates Membranmodul 8 zwischen Kulturraum 2 und den Behälter für Dialyseflüssigkeit 1 zwischengeschaltet werden kann.

Der Aufbau des Membranmodules 8 besteht aus insgesamt zwei Gruppen von Räumen, die jeweils in einer Mehrzahl vorhanden sind, zum einen jene Räume, in denen sich Kulturflüssigkeit 17 befindet bzw. durch die diese strömt, und zum anderen jene Räume, die die Dialyseflüssigkeit enthalten. Im vorliegenden Fall bildet die Dialysemembran im Membranmodul 8 Röhren aus, hierin summarisch als röhrenförmige Membran bezeichnet, innerhalb derer die Kulturflüssigkeit geführt wird. Die dazwischen liegenden Räume, durch das Membranmaterial von der Kulturflüssigkeit getrennt, werden von der Dialyseflüssigkeit durchströmt. Das Modul ist über die Zuleitung 13 und die Ableitung 14 mit dem Kulturgefäß verbunden. Im Falle einer Suspensionskultur im Kulturraum 2 durchströmen die Zellen hierbei das Innere der röhrenförmigen Membran(en) von unten nach oben. Die Membranaußenwand wird von der Dialyseflüssigkeit umströmt, die über die Leitungen 11 und 12 mit dem Behälter für Dialyseflüssigkeit 1 ausgetauscht wird. Insoweit bilden Zuleitung 13 und Ableitung 14 und Zuleitung 11 und Ableitung 12 jeweils einen Satz für die Zu- und Abfuhr von flüssigem Medium zu und von dem durch die röhrenförmige(n) Membran(en) ausgebildeten Raum bzw. zu und von dem außerhalb des durch die röhrenförmige(n) Membran(en) ausgebildeten Raumes gelegenen Raum. In der vorliegenden Ausführungsform ist dabei vorgesehen, daß für die beiden Seiten des Dialysemoduls, d. h. Dialyseflüssigkeit bzw. zu dialysierende Flüssigkeit, d. h. Kulturflüssigkeit, nur jeweils eine Zu- bzw. Ableitung vorgesehen ist. Es ist jedoch auch möglich, jeweils mehrere dieser Zu- bzw. Ableitungen auf einer jeden Seite vorzusehen.

Sofern das erfindungsgemäße Membranmodul in dem erfindungsgemäßen Reaktionssystem eingebaut vorliegt, wird eine Druckerhöhung im Membranmodul zweckmäßigerweise durch eine gleichzeitige Erhöhung des Drucks im Behälter für Dialyseflüssigkeit 1 und dem Kulturraum 2 erreicht. Durch diese Maßnahme ist es möglich, wie eigene Experimente gezeigt haben, eine Sauerstoffversorgung im notwendigen Bereich zwischen 5 und 15 g/(l h) [d.h. kg O<sub>2</sub> pro m<sup>3</sup> Kulturflüssigkeit und Stunde] ohne weiteres zu realisieren

Das Gas oder Gasgemisch strömt das durch die Zuführleitung 15 durch den Innenraum der Membran 3, verläßt das Membranmodul durch die Ableitung 14, gelangt von dort in das

Kulturgefäß 2 und verläßt dieses zusammen mit dem Abgas des ebenfalls mit Sauerstoff versorgten Kulturraums 2 durch die Öffnung 6 im Deckel des Kulturraums 2.

Das Gas wird über die Röhrchen 16 in den Innenraum der Membran 3 unter einem gewissen Überdruck eingebracht. Abhängig von der Höhe des Überdruckes erhält das Gas eine gewisse Geschwindigkeit, mit der es in die die Mikroorganismen enthaltende Suspension eintritt. Da das Gas durch die Flüssigkeit abgebremst wird, überträgt sich ein Impuls auf die Flüssigkeit, die zur Förderung der Flüssigkeit im Inneren der röhrenförmigen Membran 3 beiträgt. Ein weiterer Fördereffekt entsteht aufgrund des hohen Gasgehalts, der sich im Membraninnenraum einstellt. Da dieser Gasgehalt bei entsprechend starker Gaszufuhr höher als im eigentlichen Kulturraum 2 ist, stellt sich ein zusätzlicher Pumpeffekt ein (Mammutpumpeneffekt). Aus diesem Grund kann bei entsprechend hoher Begasung des Membranmoduls auf die Förderpumpe 10 in einem die erfindungsgemäße Vorrichtung enthaltenden Reaktionssystem verzichtet werden.

Das Membranmodul 8 wird im Regelfall möglichst nahe am Kulturraum 2 angebracht, damit die unbegaste Zufuhrleitung 13 zwischen Kulturraum und Membranmodul möglichst kurz ist und demzufolge die in der Kulturflüssigkeit enthaltenen Zellen nur möglichst kurz den Bedingungen einer nicht optimalen Gasversorgung ausgesetzt sind.

Figur 4 zeigt einen Querschnitt durch ein Membranmodul, das erfindungsgemäß für das Begasen von Kulturflüssigkeit für die Kultivierung von Zellen verwendet werden kann. Der in Fig. 4 konkret dargestellte Querschnitt stammt von einem kommerziell erhältlichen Plattenmodul mit der Bezeichnung Gambro LunDia: Alpha 600 der Firma Gambro Medizintechnik GmbH. Das Membranmaterial ist Cuprophane<sup>®</sup>. Die Wandstärke der Membran beträgt 8 µm (im trockenen Zustand), die Membranfläche beträgt 1,3 m<sup>2</sup> und die Anzahl der Membranlagen pro Modul beträgt 70. Das Volumen des Raumes 17, der bei einem erfindungsgemäßen Betrieb Kulturflüssigkeit und Zellen enthält, beträgt 100 ml.

Derartige Membranmodule werden derzeit lediglich in der Hämodialyse verwendet und zu diesem Zweck hergestellt, nicht jedoch bei der Kultivierung von Zellen und insbesondere nicht in einem Reaktionssystem der gattungsgemäßen Art, wie dies schematisch für den Fall, daß das Membranmodul als eigenständige Einheit angeordnet ist, in Fig. 1 und Fig. 2 dargestellt ist.

Im Rahmen von Untersuchungen wurde überraschenderweise festgestellt, daß unter bestimmten Voraussetzungen auch diese kommerziell erhältlichen Membranmodule dann verwendet werden können, wenn infolge ihres Flächen-Volumen-Verhältnisses und des Permeabilitätskoeffizienten für Sauerstoff eine für die Zellen ausreichende indirekte Sauerstoffversorgung gewährleistet wird.

Hierzu sind einige im folgenden angeführte Überlegungen anzustellen und insbesondere die Permeabilitätskoeffizienten für Sauerstoff zu bestimmen, was jedoch im Rahmen der Fähigkeiten des Durchschnittsfachmannes erfolgen kann. Die Bestimmung von Permeabilitätskoeffizienten ist zum Beispiel für die Verbindung Glycerin beschrieben in Märkl, H. et al. Appl. Microbiol. Biotechnol. (1993) 39: 48-52.

Bei dem beispielhaft hier angesprochenen Plattenmodul Gambro LunDia Alpha 600 ermöglicht die vorgegebene Konstruktion ein extrem hohes Verhältnis von Membranfläche zu zu versorgendem Volumen.

Die aktive Membranfläche beträgt bei der Ausführung LunDia Alpha 600  $1,3 \text{ m}^2$ . Das Volumen des mit Sauerstoff zu versorgenden Raumes beträgt 100 ml, so daß das Flächen-Volumen-Verhältnis

$$F/V = 13 \text{ m}^2/\text{l (LunDia)}$$

beträgt.

Im Vergleich sei das entsprechende Flächen-Volumen-Verhältnis für ein Membranröhrchen angegeben, wie es in der in Fig. 2 skizzierten Anordnung eingesetzt wird. In diesem Fall muß

der Innenraum des Röhrchens versorgt werden. Als Transportfläche steht die Mantelfläche der zylinderförmigen Membranfläche zur Verfügung. Am Beispiel eines Röhrchens mit 5 mm Durchmesser errechnet sich

$$F/V = 0,8 \text{ m}^2/\text{l} \text{ (5 mm Röhrchen)}$$

Bei einem Röhrchendurchmesser von nur 1 mm erhält man einen Wert von

$$F/V = 4 \text{ m}^2/\text{l} \text{ (1 mm Röhrchen)}.$$

Eine Beispielrechnung zeigt, daß mit dem Membranmodul LunDia Alpha 600 tatsächlich über die Membran eine ausreichende indirekte Sauerstoffversorgung erreicht werden kann:

Der Sauerstofftransport, bezogen auf das zu versorgende Volumen, beträgt:

$$\dot{S} = F/V \cdot P \cdot (c_1 - c_2)_{\text{Mittel}}$$

Hierbei ist  $F/V = 13 \text{ m}^2/\text{l}$ .

P ist der Permeabilitätskoeffizient. Dieser wurde in eigenen Experimenten für eine Membran, Typ Cuprophane, wie sie im genannten Modul eingesetzt wird, zu  $P = 0,066 \text{ cm}/\text{min}$  bestimmt. Dieser Wert gilt für eine Membran der Dicke  $20 \mu\text{m}$  (Dicke gemessen im trockenen Zustand). Im Membranmodul LunDia Alpha 600 wird eine Cuprophane-Membran der Dicke  $8 \mu\text{m}$  eingesetzt, so daß der tatsächliche Permeabilitätskoeffizient eher höher liegt und die vorgestellte Rechnung einen eher „unteren“ Wert ergibt.

Das Konzentrationsgefälle  $(c_1 - c_2)$  über die Membran wird mit

$$(c_1 - c_2)_{\text{Mittel}} = 11,45 \text{ mg/l}$$



angenommen. In diesem Rechenbeispiel wird davon ausgegangen, daß dem Membranmodul aus dem Behälter für Dialyseflüssigkeit 1 ein Dialysat mit einem Sauerstoffgehalt von 30 mg/l zufließt. Hierbei wird angenommen, daß der Behälter mit reinem Sauerstoff begast wird (die Sättigungskonzentration für reinen Sauerstoff beträgt ca. 32 mg/l). Im Membranmodul wird das Dialysat auf eine Konzentration von 4 mg/l abgereichert. Mit dieser Konzentration wird das Dialysat wieder dem Behälter zugeführt. Es ist also auf der Dialysatseite mit einem Sauerstoffgehalt  $c_1$  zu rechnen, der sich von 30 mg/l (Moduleingang) auf 4 mg/l (Modulaustritt) verringert. Der Sauerstoffgehalt auf der Kulturseite soll bei einem für das Wachstum der Organismen ausreichenden Wert von konstant  $c_2 = 1$  mg/l liegen. Mit diesen Annahmen berechnet sich

$$(c_1 - c_2)_{\text{Minel}} = \frac{(c_{1\text{Eingang}} - c_2) - (c_{1\text{Ausgang}} - c_2)}{\ln((c_{1\text{Eingang}} - c_2)/(c_{1\text{Ausgang}} - c_2))} = 11.45 \text{ mg/l}$$

Mit den angenommenen Daten ergibt sich ein Wert für die auf das Kulturvolumen bezogene Sauerstoffversorgung von

$$\dot{S} = 5.9 \text{ g/(l} \cdot \text{h)}.$$

Da der tatsächliche Permeabilitätskoeffizient, der die Durchlässigkeit der Membran für Sauerstoff angibt, in der Realität wegen der geringen Membrandicke von nur 8 µm deutlich über dem in der Rechnung angenommenen Wert von 0,066 cm/min liegt, wird in der Realität eine bessere Sauerstoffversorgung der Organismensuspension in der Membran erreicht werden, als er hier rechnerisch angegeben wird. Es kann also davon ausgegangen werden, daß die Sauerstoffversorgung von Mikroorganismen in einem externen Membranmodul über die Membran, wenn das Flächen-Volumen-Verhältnis ausreichend groß ist und eine gute Permeabilität der Membran für Sauerstoff vorliegt, in einem Bereich liegt, der als „ausreichend“ anzusehen ist.

Der Begriff „ausreichend“ orientiert sich am Bedarf der jeweiligen Zellen bzw. an der Versorgung, wie sie in dem Kulturgefäß 2 realisiert wird. Bei der technischen Kultur von *E. coli* Zellen, um ein Beispiel zu nennen, sind Werte üblich, die im Bereich zwischen 5 und 15 g / (l h) liegen.

Aufgrund dieser Zusammenhänge kann der Fachmann in Kenntnis bzw. nach Bestimmung des Sauerstoffpermeabilitätskoeffizienten sowie des Flächen-Volumen-Verhältnisses des jeweils verwendeten Moduls leicht ermitteln, ob dieses für die erfindungsgemäße Verwendung geeignet ist. Für den Fall, daß mit dem Membranmodul die erwünschte Versorgung mit Gas nicht gewährleistet werden kann, kann ein Membranmodul nach Fig. 3 verwendet werden und dann sowohl eine indirekte als auch direkte Sauerstoffversorgung vorgenommen werden.

Die vorstehend geschilderten Zusammenhänge wurde vom Erfinder völlig überraschend erkannt und insbesondere die Möglichkeit, das ansonsten lediglich für die Hämodialyse verwendete System in dem gattungsgemäßen Reaktionssystem als separates Membranmodul einzusetzen, wobei, wie im Zusammenhang mit Fig. 2 weiter erläutert ist, der Sauerstoffeintrag in die Dialyseflüssigkeit von Behälter 1 erfolgt und die solchermaßen angereicherte Dialyseflüssigkeit genügend Sauerstoff transportiert, um den Kulturraum 2 bzw. die darin enthaltenen Zellen zu versorgen und, in einem weiteren Aspekt, insbesondere die bei der Passage des Membranmoduls unter Sauerstofflimitierung leidenden Zellen in hinreichender bzw. erforderlicher Weise mit Sauerstoff zu versorgen, so daß die in der Kulturflüssigkeit erzielbare Zelldichte nicht durch die besagte Sauerstofflimitierung bei der Passage der Zellen durch das Membranmodul begrenzt wird. Zwar war die Verwendung von Dialysemembranen zur Entfernung von toxischen Stoffwechselprodukten, wie auch eingangs bereits ausgeführt, bekannt, jedoch war nicht bekannt, daß bei Verwendung von entsprechenden Membranen gleichzeitig die vorstehend geschilderte Sauerstoffversorgung gewährleistet werden kann. Es besteht somit ein Zusammenhang zwischen der erfindungsgemäßen Vorrichtung sowie der erfindungsgemäßen Verwendung dergestalt, daß das zu lösende Problem darin bestand, eine Sauerstofflimitierung der Zellen während deren Passage durch das Membranmodul zu vermeiden. Dies wird im Falle der erfindungsgemäßen Vorrichtung dadurch erreicht, daß bevorzugt in den

Innenraum der membranförmigen Membranen Sauerstoff eingeblasen wird und im Falle der erfindungsgemäßen Verwendung der kommerziell erhältlichen Plattenmodule solche ausgewählt werden mit einem ausreichend großen Flächen-Volumen-Verhältnis sowie ausreichend hohem Sauerstoffpermeabilitätskoeffizienten, so daß die im Behältnis für die Dialyseflüssigkeit 1 mit Sauerstoff angereicherte Dialyseflüssigkeit diesen über die Dialysemembran an die durch das Membranmodul passagierenden Zellen abgeben kann. In beiden Fällen wird das Problem der Sauerstofflimitierung der das Membranmodul passierenden Zellen gelöst.

Ein vorstehend beschriebenes und in Fig. 4 schematische dargestelltes Membranmodul kann in dem gattungsgemäßen Reaktionssystem verwendet werden, wie dies beispielsweise in Fig. 2 dargestellt ist.

Die in der vorstehenden Beschreibung, den Ansprüchen sowie den Zeichnungen offenbarten Merkmale der Erfindung können sowohl einzeln als auch in beliebigen Kombinationen für die Verwirklichung der Erfindung in ihren verschiedenen Ausführungsformen wesentlich sein.

MM3667

Bezugszeichenliste

- 1 Behälter für Dialyseflüssigkeit
- 2 Kulturraum
- 3 Dialysemembran
- 4 Rührwerk (im Kulturraum)
- 5 Gaszufuhrleitung
- 6 Abluftleitung
- 7 Gasbläschen
- 8 Membranmodul
- 9 Pumpe (für Dialyseflüssigkeit)
- 10 Pumpe (für Kulturflüssigkeit)
- 11 Leitung (für Dialyseflüssigkeit)
- 12 Leitung (für Dialyseflüssigkeit)
- 13 Leitung (für Kultursuspension)
- 14 Ableitung (für Kultursuspension)
- 15 Zufuhrleitung (für Röhrchen 16)
- 16 Röhrchen
- 17 Kulturflüssigkeit
- 18 Dialyseflüssigkeit
- 19 Stützstrukturen
- 20 Leitung (zum Membranmodul)
- 21 Gaszufuhrleitung
- 22 Abluftleitung
- 23 Rührwerk (im Behälter für Dialyseflüssigkeit)

37

# BOEHMERT & BOEHMERT

## ANWALTSSOZIENTÄT

Boehmert & Boehmert • P.O.B. 43 02 54 • D-80732 München

Deutsches Patent- und Markenamt  
Zweibrückenstr. 12  
80297 München

DR.-ING. KARL BOEHMERT, PA (1899-1973)  
DIPL.-ING. ALBERT BOEHMERT, PA (1905-1993)  
WILHELM J. H. STAHLBERG, RA, Bremen  
DR.-ING. WALTER HOORMANN, PA\*, Bremen  
DIPL.-PHYS. DR. HEINZ GODDAR, PA\*, München  
DR.-ING. ROLAND LIESEGANG, PA\*, München  
WOLF-DIETER KUNTZE, RA, Bremen, Alicante  
DIPL.-PHYS. ROBERT MÜNZHUBER, PA (1933-1992)  
DR. LUDWIG KOUKER, RA, Bremen  
DR. (CHEM.) ANDREAS WINKLER, PA\*, Bremen  
MICHAELA HUTH-DIERIG, RA, München  
DIPL.-PHYS. DR. MARION TÖNHARDT, PA\*, Düsseldorf  
DR. ANDREAS EBERT-WEIDENFELLER, RA, Bremen  
DIPL.-ING. EVA LIESEGANG, PA\*, München

PROF. DR. WILHELM NORDEMANN, RA, Brandenburg  
DR. AXEL NORDEMANN, RA, Berlin  
DR. JAN BERND NORDEMANN, LL.M., RA, Berlin  
DIPL.-PHYS. EDUARD BAUMANN, PA\*, Hohenkirchen  
DR.-ING. GERALD KLÖPSCH, PA\*, Düsseldorf  
DIPL.-ING. HANS W. GROENING, PA\*, München  
DIPL.-ING. SIEGFRIED SCHIRMER, PA\*, Bielefeld  
DIPL.-ING. DR. JAN TÖNNIES, PA, RA, Kiel  
DIPL.-PHYS. CHRISTIAN BIEHL, PA\*, Kiel  
DIPL.-PHYS. DR. DOROTHEE WEBER-BRULS, PA\*, Frankfurt  
DR.-ING. MATTHIAS PHILIPP, PA\*, Bremen  
DIPL.-PHYS. DR. STEFAN SCHOHE, PA\*, München  
MARTIN WIRTZ, RA, Bremen  
DR. DETMAR SCHÄFER, RA, Bremen  
DIPL.-CHEM. DR. ROLAND WEIB, PA, Düsseldorf  
DIPL.-PHYS. DR.-ING. UWE MANASSE, PA, Bremen  
DR. CHRISTIAN CZYCHOWSKI, RA, Berlin  
DR. CARL-RICHARD HAARMANN, RA, München  
DIPL.-BIOL. DR. ARMIN K. BOHMANN, PA, München  
DIPL.-PHYS. DR. THOMAS L. BITTNER, PA, Berlin  
DR. VOLKER SCHMITZ, RA, München  
DR. FRIEDRICH NICOLAUS HEISE, RA, Potsdam

PA - Patentanwalt/Patent Attorney  
RA - Rechtsanwalt/Attorney at Law  
\* - European Patent Attorney  
Alle zugelassen zur Vertretung vor dem Europäischen Markenamt, Alicante  
Professional Representatives of the Community Trademark Office, Alicante

In Zusammenarbeit mit/in cooperation with  
DIPL.-CHEM. DR. HANS ULRICH MAY, PA\*, München

Ihr Zeichen  
Your ref.

Ihr Schreiben  
Your letter of

Unser Zeichen  
Our ref.

München,

Neuanmeldung  
(Patent)

MM3667

21. September 1999

Professor Dr. Herbert Märkl, Kleckener Kirchweg 27, 21218 Seevetal

### Verfahren zur Kultivierung von Zellen, Membranmodul, Verwendung eines Membranmoduls und Reaktionssystem zur Kultivierung von Zellen

#### Ansprüche

1. Verfahren zur Kultivierung von Zellen unter Verwendung eines Reaktionssystems, wobei das Reaktionssystem einen Behälter für Dialyseflüssigkeit, einen Raum für die Kultivierung von Zellen sowie ein beide Räume miteinander verbindendes Membranmodul umfaßt, wobei das Membranmodul mindestens zwei durch eine Membran getrennte Räume aufweist, deren einer von einer Dialyseflüssigkeit und deren anderer von Zellen enthaltender Kulturflüssigkeit durchströmt wird, und ein erstes Gas in die

- 17.85 -

Franz-Joseph-Straße 38 • D-80801 München • P.O.B. 43 02 54 • D-80732 München • Telefon +49-89-3840720 • Telefax +49-89-347010

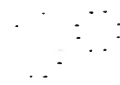
MÜNCHEN - BREMEN - BERLIN - FRANKFURT - DÜSSELDORF - POTSDAM - BRANDENBURG - HÖHENKIRCHEN - KIEL - BIELEFELD - ALICANTE

<http://www.boehmert.de>

e-mail: [postmaster@boehmert.de](mailto:postmaster@boehmert.de)

Kulturflüssigkeit in dem Raum für die Kultivierung der Zellen eingetragen wird, dadurch gekennzeichnet, daß ein zweites Gas in die Kulturflüssigkeit im Membranmodul eingetragen wird.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß eine direkte Begasung der im Membranmodul befindlichen Kulturflüssigkeit erfolgt, indem das zweite Gas direkt in die Kulturflüssigkeit im Membranmodul eingetragen wird.
3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß eine indirekte Begasung der im Membranmodul befindlichen Kulturflüssigkeit erfolgt, indem das zweite Gas in die Dialyseflüssigkeit in dem Behälter für die Dialyseflüssigkeit eingetragen wird und von dort über die Membran des Membranmoduls in die im Membranmodul befindliche Kulturflüssigkeit gelangt.
4. Verfahren nach Anspruch 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, daß neben der direkten Begasung gleichzeitig die indirekte Begasung erfolgt.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß das Membranmodul mindestens ein Gaszufuhrmittel umfaßt und das Gaszufuhrmittel das zweite Gas zu mindestens einem der durch die Membran getrennten, eine Flüssigkeit führenden Räume zuführt.
6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß das Gaszufuhrmittel eine Austrittsöffnung aufweist, die sich insbesondere in dem die Kulturflüssigkeit führenden Raum des Membranmoduls befindet.
7. Verfahren nach Anspruch 5 oder 6, dadurch gekennzeichnet, daß das Gaszufuhrmittel ein Röhrchen ist.



8. Verfahren nach einem der Ansprüche 5 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß das Gaszufuhrmittel als Düse ausgebildet ist.
9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß die Membran des Membranmoduls aus einem Material besteht, das ausgewählt ist der Gruppe, die regenerierte Cellulose, Polyamid, Polypropylen und Polysulfon umfaßt.
10. Verfahren nach Anspruch 1 bis 4 und 9, dadurch gekennzeichnet, daß das Membranmodul ein Plattenmodul ist.
11. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß die Membran des Membranmoduls eine Dialysemembran ist.
12. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß das Material der Dialysemembran Cuprophan ist
13. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß das Membranmodul bedingt durch sein Flächen-Volumen-Verhältnis und seinen Permeabilitätskoeffizienten für das Gas einen für die Zellen ausreichenden Gasaustausch vorsieht.
14. Verfahren nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß das Flächen-Volumen-Verhältnis mindestens etwa  $5 \text{ m}^2$  pro Liter, insbesondere mindestens  $10 \text{ m}^2$  pro Liter beträgt.
15. Verfahren nach Anspruch 14 dadurch gekennzeichnet, daß das Flächen-Volumen-Verhältnis etwa  $13 \text{ m}^2$  pro Liter beträgt.
16. Verfahren nach einem der Ansprüche 13 bis 15, dadurch gekennzeichnet, daß der Sauerstoff-Permeabilitätskoeffizient etwa  $0,066 \text{ cm}$  pro Minute oder mehr beträgt.

17. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 16, dadurch gekennzeichnet, daß der Behälter für Dialyseflüssigkeit ein Mittel zum Zuführen von Gas und/oder ein Mittel zum Abführen von Gas aufweist.
18. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 17, dadurch gekennzeichnet, daß das Membranmodul, der Raum für die Kultivierung der Zellen und/oder der Behälter für Dialyseflüssigkeit einen erhöhten Druck aufweist.
19. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 18, dadurch gekennzeichnet, daß das erste und zweite Gas einzeln und unabhängig voneinander ausgewählt sind aus der Gruppe, die Luft, Sauerstoff, Stickstoff, Kohlendioxid und Mischungen davon umfaßt.
20. Verfahren nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, daß das zweite Gas Sauerstoff ist.
21. Verfahren nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, daß das zweite Gas Kohlendioxid ist.
22. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 21, dadurch gekennzeichnet, daß die Zellen ausgewählt sind aus der Gruppe, die mikrobielle Zellen, Pilzzellen, tierische Zellen und pflanzliche Zellen umfaßt.
23. Verfahren nach Anspruch 22, dadurch gekennzeichnet, daß die Zellen Zellen von *Escherichia coli* sind.
24. Membranmodul welches mindestens zwei durch eine Membran getrennte Räume umfaßt und jeder Raum mit einer Flüssigkeit durchströmt wird, wobei die Flüssigkeit in einem Raum Dialyseflüssigkeit und in dem anderen Raum Kulturflüssigkeit ist, dadurch gekennzeichnet, daß das Membranmodul mindestens ein Gaszufuhrmittel um-



faßt und das Gaszufuhrmittel in mindestens einem der durch die Membran getrennten Räume eine Austrittsöffnung aufweist.

25. Membranmodul nach Anspruch 24, dadurch gekennzeichnet, daß die Membran röhrenförmig ausgebildet ist und durch ihr Volumen einen der beiden Räume ausbildet.
26. Membranmodul nach Anspruch 25, dadurch gekennzeichnet, daß der Durchmesser des durch die röhrenförmige Membran ausgebildeten Raumes etwa 3 - 10 mm, bevorzugt 6 - 8 mm, beträgt.
27. Membranmodul nach Anspruch 25 oder 26, dadurch gekennzeichnet, daß das Membranmodul mehrere durch eine röhrenförmige Membran ausgebildete Räume umfaßt.
28. Membranmodul nach Anspruch 27, dadurch gekennzeichnet, daß sich in mindestens einem der durch die röhrenförmige Membran ausgebildeten Räume eine Austrittsöffnung des Gaszufuhrmittels befindet.
29. Membranmodul nach einem der Ansprüche 24 bis 28, dadurch gekennzeichnet, daß sich die Austrittsöffnung des Gaszufuhrmittels in einem Raum außerhalb des/der durch die röhrenförmige Membran ausgebildeten Raumes/Räume befindet.
30. Membranmodul nach einem Ansprüche 24 bis 29, dadurch gekennzeichnet, daß das Gaszufuhrmittel ein Röhrchen ist.
31. Membranmodul nach Anspruch 30, dadurch gekennzeichnet, daß das Röhrchen konzentrisch in dem Raum angeordnet ist.
32. Membranmodul nach Anspruch 30 oder 31, dadurch gekennzeichnet, daß das Röhrchen einen Innendurchmesser von 0,2 mm bis 3 mm aufweist.

33. Membranmodul nach einem der Ansprüche 24 bis 32, dadurch gekennzeichnet, daß die Austrittsöffnung des Gaszufuhrmittels als Düse ausgebildet ist.
34. Verwendung des Membranmoduls nach einem der Ansprüche 24 bis 33 als Membranmodul in einem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 23.
35. Reaktionssystem zur Kultivierung von Zellen umfassend einen Behälter für Dialyseflüssigkeit, einen Raum für die Kultivierung von Zellen und mindestens ein dazwischen geschaltetes Membranmodul, wobei das Membranmodul eine ausreichende Gasversorgung während der Passage der Kulturflüssigkeit durch das Membranmodul oder einen ausreichenden Gasaustausch in der im Membranmodul befindlichen Kulturflüssigkeit gewährleistet.
36. Reaktionssystem nach Anspruch 35, dadurch gekennzeichnet, daß das Membranmodul ein solches nach einem der Ansprüche 24 bis 33 ist.
37. Reaktionssystem nach Anspruch 35 oder 36, dadurch gekennzeichnet, daß der Behälter für Dialyseflüssigkeit mindestens eine Begasungseinrichtung enthält.
38. Reaktionssystem nach Anspruch 35 oder 37, dadurch gekennzeichnet, daß die Membran des Membranmoduls einen Gaspermeabilitätskoeffizienten aufweist, der hoch genug ist, um eine ausreichende Gasversorgung während der Passage der Kulturflüssigkeit durch das Membranmodul oder einen ausreichenden Gasaustausch in der im Membranmodul befindlichen Kulturflüssigkeit zu gewährleisten und/oder ein geeignet hohes Flächen-Volumen-Verhältnis aufweist, um eine ausreichende Gasversorgung während der Passage der Kulturflüssigkeit durch das Membranmodul oder einen ausreichenden Gasaustausch in der im Membranmodul befindlichen Kulturflüssigkeit zu gewährleisten.

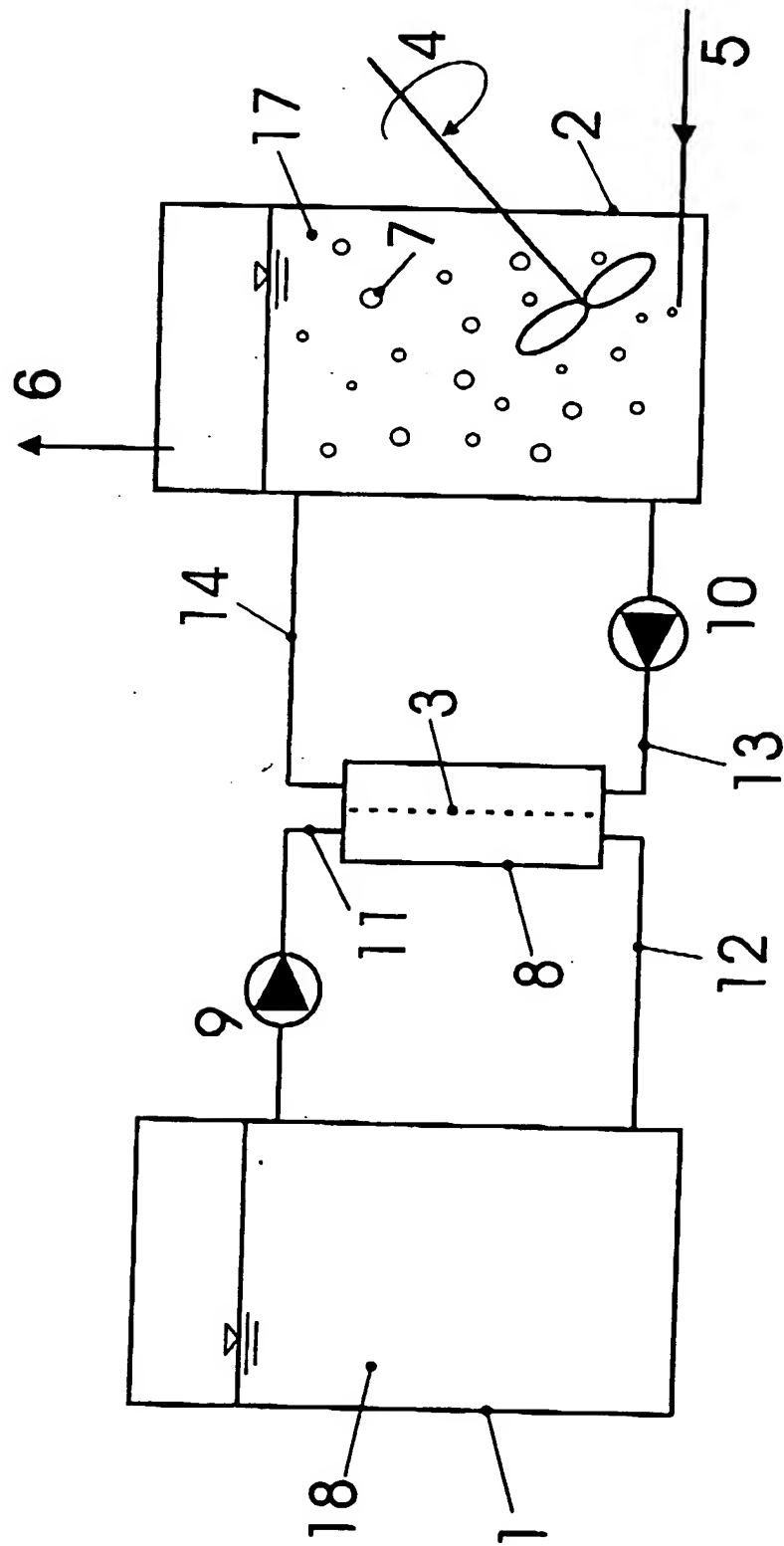
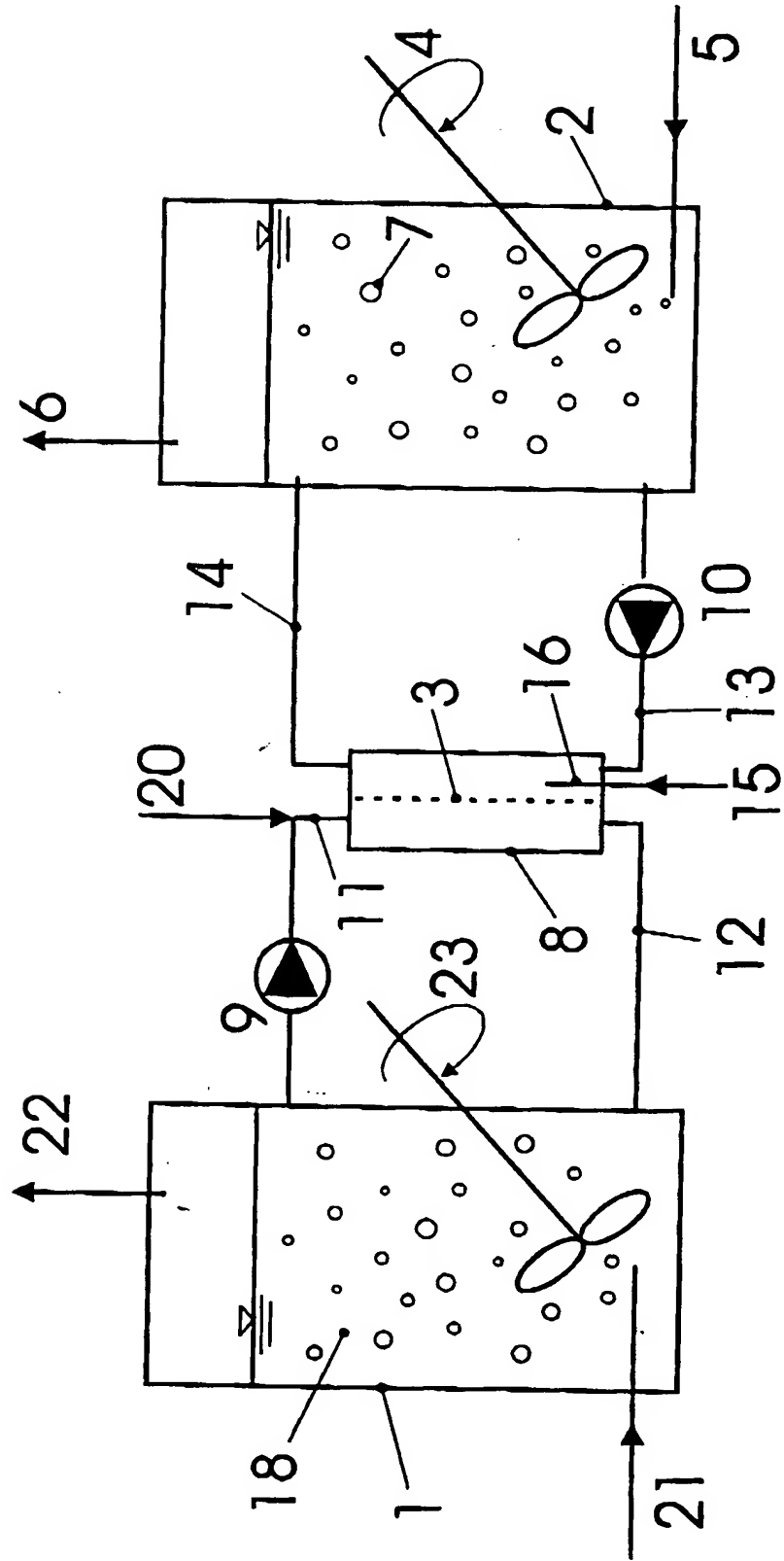


Fig. 1

Fig. 2



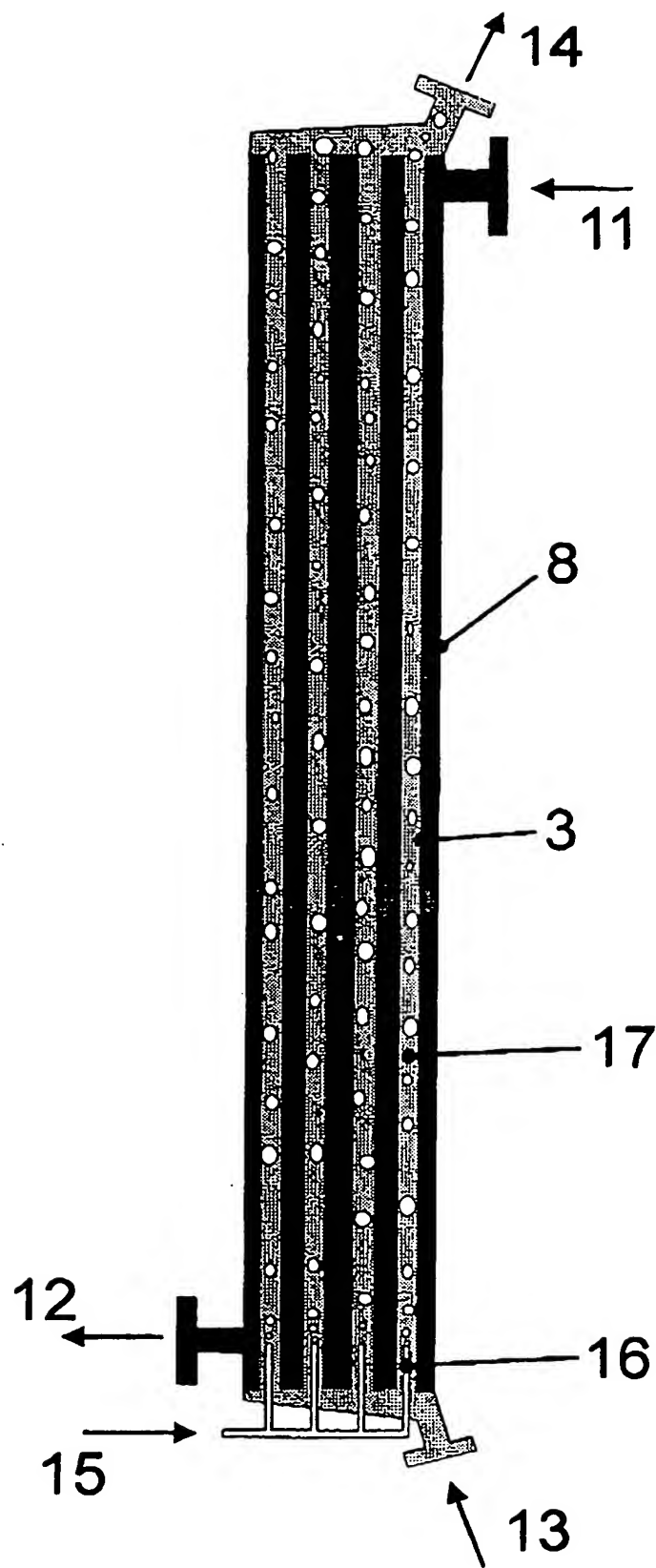


Fig. 3

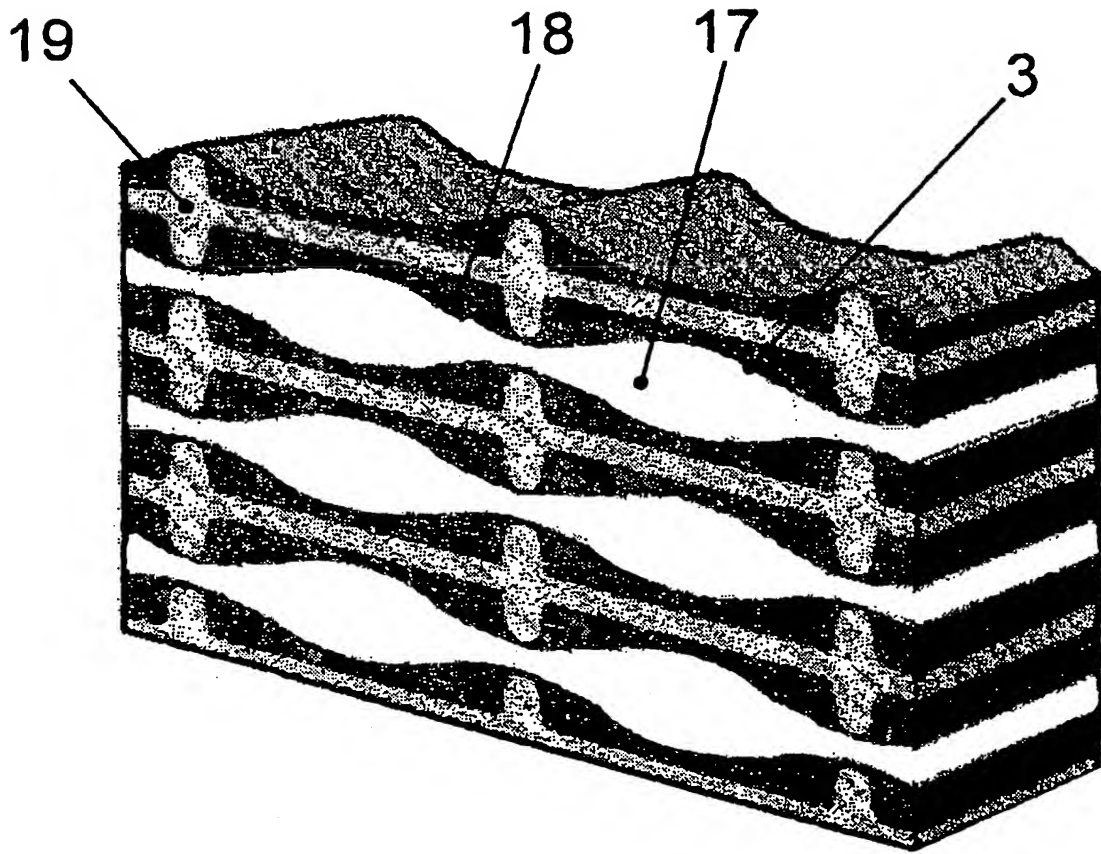


Fig. 4